

Exhibit 6



STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE PRC

[HOME](#) [ABOUT SIPPO](#) [NEWS](#) [LAW&POLICY](#) [SPECIAL TOPIC](#) [CHINA IP NEWS](#)[>>\[Patent Search\]](#)

Title: Use of compound interferon in the treating of SARS disease						
Application Number:	03150139	Application Date:	2003.07.18			
Publication Number:	1478545	Publication Date:	2004.03.03			
Approval Pub. Date:		Granted Pub. Date:	2005.05.25			
International Classification:	A61K38/21, A61P31/14, A61P11/00					
Applicant(s) Name:	Inst. of Microbiology, Chinese Academy of Sciences					
Address:	100080					
Inventor(s) Name:	Gao Guangxia					
Attorney & Agent:	hu jiaoyu					
Abstract						
An application of the composite interferon shown by SEQ ID No.1 in preparing the medicines for treating SARS, and a medicine containing said composite interferon and medical carrier for treating SARS are disclosed.						

[Close](#)

Copyright © 2007 SIPPO. All Rights Reserved

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/21

A61P 31/14 A61P 11/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03150139.7

[43] 公开日 2004年3月3日

[11] 公开号 CN 1478545A

[22] 申请日 2003.7.18 [21] 申请号 03150139.7

[71] 申请人 中国科学院微生物研究所

地址 100080 北京市海淀区中关村北一条13
号

[72] 发明人 高光侠 唐 宏

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司

代理人 胡交宇

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称 复合干扰素在治疗SARS疾病中的
用途

[57] 摘要

本发明提供了 SEQ ID NO: 1 所示的复合干扰素在制备治疗 SARS 疾病的药物中的应用。本发明还提供了一种用于治疗 SARS 疾病的药物组合物，它含有治疗有效量的 SEQ ID NO: 1 所示的复合干扰素和药物载体。

ISSN 1008-4274

-
1. SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素在制备治疗 SARS 疾病的药物中
5 的应用。
 2. 一种用于治疗 SARS 疾病的药物组合物，它含有治疗有效量的 SEQ
ID NO:1 所示的复合干扰素和药物载体。

复合干扰素在治疗 SARS 疾病中的用途

5

技术领域

本发明涉及复合干扰素的用途，和一种用于治疗 SARS（重症急性呼吸系统综合症）疾病的药物组合物。

10 背景技术：

干扰素是一类具有广谱抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等生物活性的细胞素的总称，被广泛应用于临床治疗肝炎，炎症与癌症。哺乳动物的干扰素有 α 、 β 、 γ 三种型别，其中的 α -干扰素又分为多种亚型。

八十年代初，科学家比较了当时已查明的 13 种 α -干扰素的氨基酸序列及其相关功能之后，发现它们具有很多相同之处，说明它们的相似的生物活性与功能；同时它们又具有各自特异之处，这就决定了它们各自的作用专一性。综合这些相同与相异之处，美国安进（Amgen）公司设计出一种综合各种天然干扰素优点的全人工干扰素—复合干扰素（consensus interferon）(US00/5541293A, 1996 年 7 月 15 日, SEQ ID NO:1)。复合干扰素具有天然干扰素无法匹配的优点：A. 复合干扰素集中了各种天然干扰素的优点，故而具有更强、更广谱的抗病毒作用。例如，在治疗丙型肝炎方面，干扰素 α -2b 的有效率略大于 50%，但其中近三分之二的病人停药后病情复发，因而其净治愈率只有 15-20%。与之呈鲜明对照的是，复合干扰素的总治愈率高达 40%。B. 对天然干扰素 α -2b 无法治疗的病人，复合干扰素的治愈率达 17%左右；而对于干扰素 α -2b 治疗后复发的病人，复合干扰素的治愈率高达 50%。

安进公司开发的复合干扰素于 1997 年获美国 FDA 批准上市，商品名 Infergen，临幊上用于治疗对干扰素 α -2b 治疗无效的丙型肝炎。

中国四川省生物工程研究中心于 2001 年申请了“重组高效复合干扰素用作乙型肝炎表面抗原和 e 抗原抑制剂”的国际专利保护，并于 2002

年获得批准 (WO 02 / 80958 A1)。

迄今为止的复合干扰素抗病毒活性的研究主要集中在乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒方面，而对抗其他病毒的活性评估未见文献报道。

5 发明内容

本发明的一个目的是提供一种 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素的用途。

本发明的另一个目的是提供一种用于治疗 SARS 的药物组合物。

我们在前期工作中，建立了一套复合干扰素高效表达、纯化系统，
10 能够大量产生高纯度、高活性的复合干扰素。

本发明研究了 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素抑制引起重症急性呼吸系统综合症（又称非典型性肺炎）的冠状病毒 SARS-CoV 病毒感染宿主的能力，为利用复合干扰素制备用于治疗 SARS-CoV 病毒引起的非典型性肺炎提供一种新的方法。本发明分析了 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素在细胞培养系统中抗 SARS-CoV 病毒的活性，发现 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素能有效抑制 SARS-CoV 病毒的感染和复制。本发明发现 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素能够非常有效地抑制引起重症急性呼吸系统综合症的冠状病毒 SARS-CoV 病毒感染宿主细胞，抑制活性比干扰素 α -2b 高 10 倍以上。
15

20 本发明提供了一种 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素在制备治疗 SARS 疾病的药物中的应用。

本发明还提供了一种用于治疗 SARS 疾病的药物组合物，它包括治疗有效量的 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素和药物载体。
25

附图说明：

图 1 是 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素抗 SARS 病毒感染活性测定图。用不同浓度 SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素或干扰素 α -2b (IFN α -2b) 处理的细胞用 SARS-CoV 病毒感染，72 小时后用 MTT 方法测定活细胞数。图 1A 中 SARS-CoV 的病毒滴度为 10^{-2} ，图 1B 中 SARS-CoV 的病毒滴度为 10^{-5} 。
30

实施例

下面通过优选实例对本发明做更详细的描述。

SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素抗 SARS-CoV 病毒的活性测定：

5 1. 病毒滴度测定：

SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素通过本领域公知的基因表达方法生产。SARS-CoV 病毒原液经 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释，取样感染于 96 孔板培养的 Vero E6 细胞，每孔 100 微升，重复 8 孔，吸附 2 小时，弃病毒液，分别加入含 2.5% 胎牛血清的 MEM 培养液，每孔 100 微升，平行做未感染阴性对照，37°C 5% CO₂ 培养箱培养 72 小时后，培养板于倒置显微镜下观察并记录病毒感染后出现的细胞病变 (CPE)，记录出现 CPE 的细胞孔数，按公知的 Reed-McCormick 法计算病毒滴度，以半数细胞感染剂量 (TCID₅₀) 表示。SARS-CoV 病毒原液滴度的测定结果见表 1。测试结果表明，高于 50% 组病变率为 60，低于 50% 组病变率为 7，15 高于 50% 组稀释度对数值为 6，经计算，本实验例中所用 SARS-CoV 病毒的 TCID₅₀ 为 6.19。

2. SEQ ID NO:1 所示的复合干扰素抗 SARS-CoV 病毒活性测定及与干扰素 α - 2b 的比较：

Vero E6 细胞常规传代，取生长优良的单层细胞 1~2 瓶，用胰酶消化、计数、调整细胞浓度至 1×10^5 /ml，接种于 96 孔细胞培养板、每孔 100 微升。待细胞达 80~90% 单层时，弃培养上清，分别用 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释的复合干扰素、干扰素 α - 2b 处理 24 小时，每种浓度重复 8 孔。

分别弃复合干扰素、干扰素 α - 2b 上清液，用 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释的 SARS-CoV 病毒感染经干扰素处理后的 Vero E6 细胞，平行做病毒感染阳性对照组，未感染阴性对照组，于 37°C 5% CO₂ 培养箱培养，逐日观察并记录细胞病变情况，培养 72 小时后用 MTT 法测定干扰素抑制效率。

与阴性对照（正常 Vero E6 细胞组），阳性对照（SARS-CoV 病毒感染组）细胞形态变化比较，综合 SARS-CoV 病毒感染 Vero E6 细胞致细胞

病变(CPE)的程度和MTT测定结果判定干扰素抑制病毒感染的 IC_{50} , 结果见表2;用MTT法测定培养观察72h后的各试验组细胞,定量评估干扰素对SARS-CoV病毒感染的抑制效率,结果见图1。

表2的结果显示,复合干扰素、IFN α -2b两种干扰素均能抑制SARS-CoV病毒感染宿主细胞,当病毒感染滴度为 10^{-1} 、 10^{-2} 时,其 IC_{50} 分别为 10^{-5} 、 10^{-4} 微克/微升,而降低病毒感染量(10^{-4} 、 10^{-5}),其 IC_{50} 也降低,呈量剂对应关系,复合干扰素比干扰素 α -2b的效率高10倍。图1A、B的测定值与表2的观察判断结果基本吻合,复合干扰素、干扰素 α -2b的抑制效率相差10倍以上。可见,复合干扰素较干扰素 α -2b抑制SARS-CoV病毒感染的效果更佳。

表1 SARS-CoV病毒 $TCID_{50}$ 的测定

病毒稀释度	出现CPE孔	未出现CPE孔	CEP累计孔数	无CPE累计孔数	测定孔总数	CPE(%)
10^{-3}	8	0	29	0	29	100
10^{-4}	8	0	21	0	21	100
10^{-5}	7	1	13	1	14	93
10^{-6}	5	3	6	4	10	60
10^{-7}	1	7	1	11	13	7
10^{-8}	0	8	0	19	19	0

表2 干扰素抑制SARS-CoV病毒感染细胞 IC_{50} 的测定

病毒滴度	复合干扰素 IC_{50}		阳性对照	阴性对照
	($\mu g/\mu l$)	($\mu g/\mu l$)		
10^{-1}	10^{-5}	10^{-4}	病变	正常
10^{-2}	10^{-5}	10^{-4}	病变	正常
10^{-4}	10^{-6}	10^{-5}	病变	正常
10^{-5}	10^{-6}	10^{-5}	病变	正常

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院微生物研究所

<120> 复合干扰素在治疗SARS疾病中的用途

<130> I030473

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 167

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 1

Met Cys Asp Leu Pro Gln Thr His Ser Leu Gly Asn Arg Arg Ala Leu
1 5 10 15

Ile Leu Leu Ala Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Ser Cys Leu Lys
20 25 30

Asp Arg His Asp Phe Gly Phe Pro Gln Glu Glu Phe Asp Gly Asn Gln
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Ala Ile Ser Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln
50 55 60

Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu
65 70 75 80

Ser Leu Leu Glu Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp
85 90 95

Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Glu Val Gly Val Glu Glu Thr Pro Leu
100 105 110

Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Ala Val Lys Lys Tyr Phe Gln Arg Ile
115 120 125

Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val
130 135 140

Val Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln
145 150 155 160

Glu Arg Leu Arg Arg Lys Glu
165

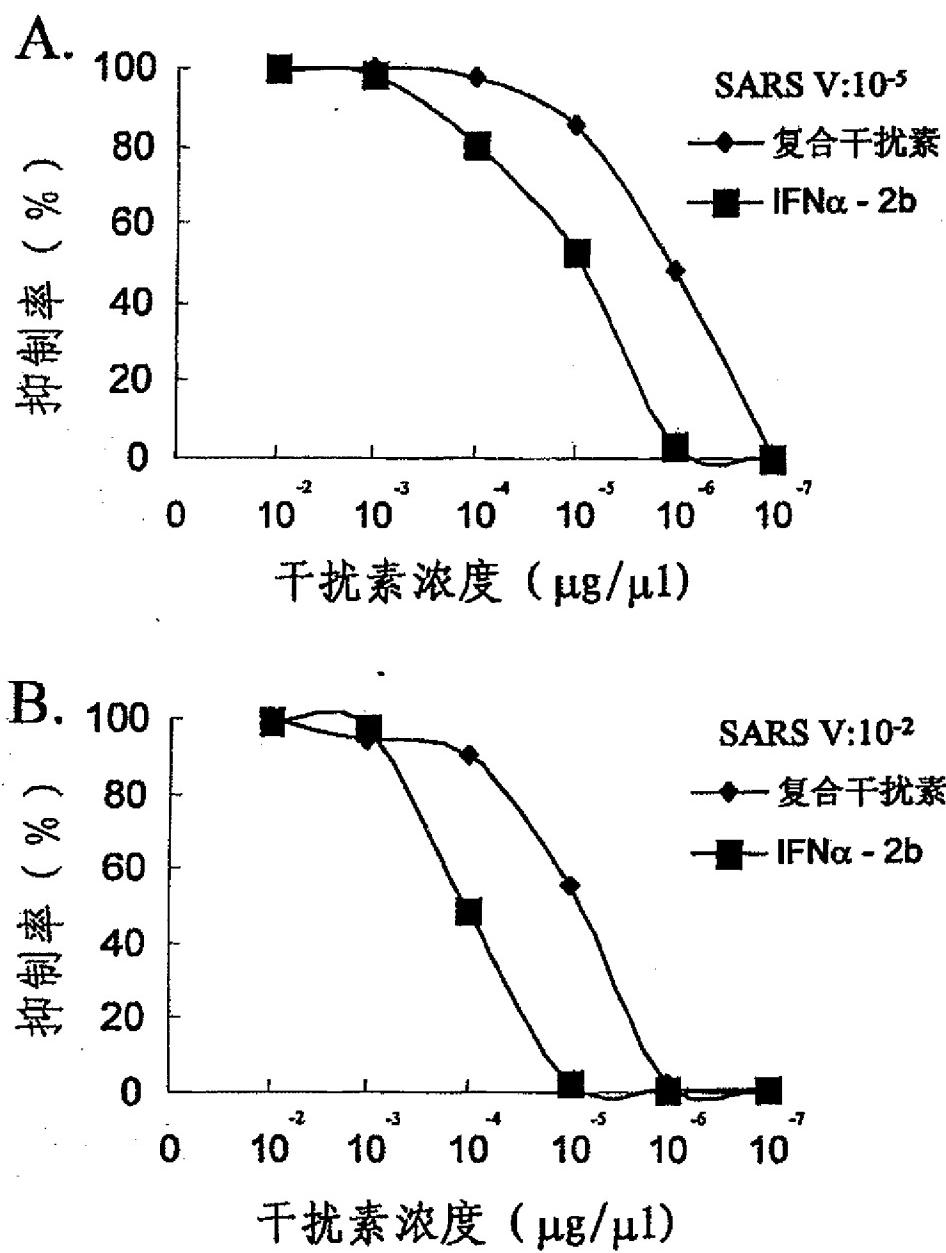


图 1